

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
TEHNOLOOGIAINSTITUUT

HIV-1 viiruslaadsete partiklite mahasurumine triaziini- põhiste ühenditega

Bakalaureusetöö
Lõputöö maht (12 EAP)
Tatjana Pungar

Juhendaja:
Eva Žusinaite, MD, PhD

TARTU 2017

Infoleht

HIV-1 viiruslaadsete partiklite mahasurumine triaziini-põhiste ühenditega

Tänapäeval eksisteerib pidev vajadus uute HIV-1 inhibiitorite avastamiseks. Käesoleva töö eesmärgiks oli uurida kuue uue triaziini-põhise sünteetilise ühendi võimet inhibeerida HIV-1 viiruslaadseid partikleid. Töö käigus valmistati HIV-1 viiruslaadsed partiklid, mis ekspresseerisid markerina *Gaussia* lutsiferaasi, ning leiti ühendite maksimaalsed mittetsütotoksilised kontsentratsioonid. Inhibeerimisvõime hindamiseks mõõdeti *Gaussia* lutsiferaasi aktiivsust nakatatud rakkude lüsaatidest. Parima inhibeerimisvõimega oli ühend TRZ-0, mis näitas doosist sõltuvat mahasurumist.

Märksõnad: HIV, triaziin, inhibiitor, lutsiferaas

B230 Mikrobioloogia, bakterioloogia, viroloogia, mükoloogia

Inhibition of HIV-1 virus-like particles with triazine-based compounds

Nowadays, there is constant need for novel HIV-1 inhibitors. The aim of this work was to assay inhibitory effects of six novel triazine-based compounds on HIV-1 virus-like particles expressing *Gaussia* luciferase. During this work, the HIV-1 virus-like particles were produced, and maximal non-toxic concentrations of the compounds were found. The inhibitory effect was assessed by measuring *Gaussia* luciferase activity in infected cell lysates. Out of six compounds, TRZ-0 showed the best effect demonstrating dose-dependent inhibition.

Keywords: HIV, triazine, inhibitor, luciferase

B230 Microbiology, bacteriology, virology, mycology

Sisukord

Infoleht	2
Kasutatud lühendid	3
SISSEJUHATUS	5
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	6
1.1 HIV virion ja infektsioonitsükkel	6
Virion	6
Viiruse seondumine ja sisenemine rakku	6
Pöördtranskriptsioon ja cDNA transport raku tuuma	7
Integratsioon peremehe genoomi	9
Viiruse geenide ekspressioon, RNA transportimine tuumast välja	9
Viiruspartiklite kokkupanek, pungumine ja küpsemine	10
1.2 HIV viirus-laadsete partiklite kasutamine	11
1.3 HIV inhibiitorid	14
Mittenukleosiidsed pöördtranskriptaasi inhibiitorid	14
Uute potentsiaalsete inhibiitorite otsing	15
Triaziinid	16
2. EKSPERIMENTAALNE OSA	17
2.1 Uurimistöö eesmärgid	17
2.2 Materjal ja metoodika	17
Rakuliinid ja söötmed	17
Triaziinid	17
VLP-de tootmine ja kogumine	19
VLP-de tiitri määramine	19
Triaziinide tsütotoksilisuse määramine MTT reagentiga	20
<i>Gaussia</i> lutsiferaasi ekspressiooni kvantifitseerimine	20
Totaalse valguhulga määramine	21
3. TULEMUSED JA ARUTELU	22
3.1 Triaziinide tsütotoksilisuse analüüs	22
3.2 Triaziinide inhibeeriva toime analüüs	24
Kokkuvõte	27
Summary	28
KASUTATUD KIRJANDUS	29
LIHTLITSENTS	33

Kasutatud lühendid

AIDS – Omandatud immuunpuudulikkuse sündroom (*Acquired immunodeficiency syndrome*)
ART – Antiretroviirusteraapia (*Antiretroviral therapy*)
ARV – Antiretroviirusravi (*AntiRetroVirals*) CA – Kapsiidi valk (*Capsid protein*) cDNA – Komplementaarne DNA (*Complementary DNA*) cfu – Kolooniat moodustav ühik (*colony forming unit*)
CMV – Tsütomegaloviirus (*Cytomegalovirus*)
DATA – Diarüültriaziniid (*diaryl triazines*)
DMSO – Dimetüülsulfoksiid (*dimethyl sulfoxide*)
ER – Endoplasmaatiline retiikulum (*Endoplasmic reticulum*)
HAART – Väga aktiivne antiretroviirus-vastane teraapia (*Highly active antiretroviral therapy*)
HIV – Inimese immuunpuudulikkuse viirus (*Human immunodeficiency virus*)
IN – Integraas (*Integrase*)
InSTI – Integraas ahela ülekande inhibiitor (*Integrase strand-transfer inhibitor*)
LTR – Pikad korduvjärjestused (*Long-terminal repeats*)
MA – Maatriksvalk (*Matrix protein*)
MTT – 3-(4,5-Dimetüül-2- tiazolüül)-2,5-difenüül-2H-tetrazoliumbromiid (3-(4,5-Dimethyl-2- thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium Bromide)
NC – Nukleokapsiidi valk (*Nucleocapsid protein*)
NNRTI – Mittenukleosiidsed pöördtranskriptaasi inhibiitorid (*Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors*)
NRTI – Nukleosiidsed/Nukleotiidsed pöördtranskriptaasi inhibiitorid (*Nucleoside/Nucleotide reverse transcriptase inhibitors*)
PI – Proteaasi inhibiitorid (*Protease inhibitors*)
PR – Proteaas (*Protease*)
RRE – Rev vastuselement (*Rev Response Element*)
RSV – Rous sarkoomi viirus (*Rouse sarcoma virus*)
RT – Pöördtranskriptaas (*Reverse transcriptase*)
SV40 – Simian viirus 40 (*Simian virus*)
TM – Transmembraanne valk (*Transmembrane protein*)
VLP – Viirus-laadne partikkel (*Virus-like particle*)
VSV – Vesikulaarse stomatiidi viirus (*Vesicular stomatitis virus*)
WHO – Maailma terviseorganisatsioon (*Wolrd health organization*)

SISSEJUHATUS

Inimese immuunpuudulikkuse viirus ehk HIV (*Human Immunodeficiency virus*) avastati 1983. aastal (Costin, 2007). Siiamaani HI-viirusinfektsioon on globaalne tervishoiu probleem. Maailma tervise organisatsiooni (*World Health Organization*, WHO) andmeil seisuga 2015. aasta lõpp oli maailmas 36,7 miljonit HIV-iga nakatunut inimest (WHO, 2016).

HI-viirus kuulub retroviiruste sugukonda ning lentiviiruste perekonda. On teada kahte tüüpi HI-viirust: HIV-1 ja HIV-2. Kõige rohkem on uuritud HIV-1. HIV nakatab immuunsüsteemi rakke, mis omavad CD4 retseptoreid: T-lümfotsüüte, makrofaage, monotsüüte ja dendritrakke. Nakatumine on võimalik seksuaalkontakti kaudu, vere ülekandmisega, emalt lapsele raseduse, sünnituse või imetamise ajal. Infektsiooni viimases faasis areneb omandatud immuunpuudulikkuse sündroom ehk AIDS (*Acquired ImmunoDeficiency Syndrome*). AIDS areneb 2-15 aasta jooksul sõltuvalt indiviidilt ning on iseloomustatud kasvajate ja oportunistlike nakkuste tekkega (SYNLAB; Randoja, 2015)

HI-viiruse infektsiooni vastu on olemas ravimid, mis suudavad hoida viiruse koguse veres kontrolli all, vältida AIDSi väljakujunemist ja viiruse ülekandmist teistele inimestele. Antiretroviirusteraapias (ART) kasutatakse mitme antiretroviirusravimi (ARV, *AntiRetroVirals*) kombinatsiooni. Tänapäeval kasutatakse väga aktiivset antiretroviirusvastast, ehk HAART (*Highly Active AntiRetroViral Therapy*) teraapiat. HAART on kombinatsioon kolmest või enamast erinevasse toimeklassi kuuluvast ARVst. HIV-iga nakatanud inimene peab kasutama HAART teraapiat terve elu. Sellega kaasneb probleem – viiruse kõrge mutatsioonikiirus, mille tõttu tekivad viiruse ravimitele resistentsed variandid. Selle tõttu pidevalt arendatakse ja testitakse uusi ravimikandidaate. Selleks, et testimise käigus vältida kokkupuudet ohtliku viirusega kasutatakse ohutuid testimissüsteeme. Uusi ravimikandidaate pannakse proovile kasutades HI-viirus-laadseidpartikleid (VLP, *Virus-Like Particle*). Sellised partiklid ei ole võimelised tootma uusi partikleid, seega nad kujutavad ennast bioloogiliselt ohutut katsesüsteemi.

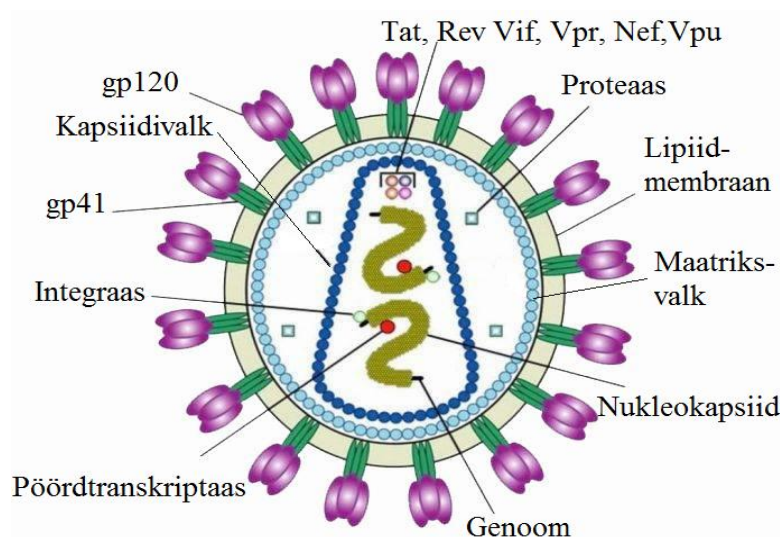
Uurimistöö eesmärgiks on uurida uute potentsiaalsete mittenukleosiidsete sünteetiliste ühendite võimet inhibeerida pseudotüpeeritud HIV-1 VLP-sid. Antud ühendid olid pakutud Alfonso Tlatoani Garcia Sosa poolt, TÜ Keemia Instituut (Molekulaartechnoloogia õppetool). Ühendid on uued ja on sünteesitud Gabriel Navarrete poolt, UAEM, Mehhiko.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 HIV virion ja infektsioonitsükkel

Virion

Nagu teised retroviiruste sugukonda kuuluvad viirused, HI-viiruse virion on membraaniga kaetud (vt. Joonis 1). Virioni ümbritsev lipiidmembraan on pärit peremehe raku plasmamembraanist. Membraani valkudeks on kaks glükoproteiini: transmembraanne (TM) gp41 ja retroviiruse peamine antirepseptor ja peamine antigeen gp120. Lipiidmembraani all paikneb maatriksvalkude (MA) kiht. Kapsiidivalgud (CA) koos viiruse genoomi- ja nukleokapsiidi valguga (NC) moodustavad nukleokapsiidi. Viiruse genoomiks on kaks identset, üheaheelalist, positiivse polaarsusega RNA-d. Samtugi, nukleokapsiidi sees paiknevad ensüümid: pöördtranskriptaas (*Reverse Transcriptase*, RT), mis on vajalik viiruse replikatsioonil; integraas (IN), mis on vajalik peremehe genoomi integreerumiseks ning proteaas (PR), mis mängib olulist rolli virioni moodustumisel ning rakust väljumisel (Sundquist, Kräusslich, 2012; Briggs *et al.*, 2012; Knipe *et al.*, 2007). Lisaks, HIV kodeerib 6 unikaalset abivalku: Tat, Rev, Vif, Vpr, Vpu ja Nef. Nendest kõige olulisemad on Tat ja Rev, kuna nad osalevad replikatsiooni regulatsioonis (Subbramania ja Cohen, 1994).



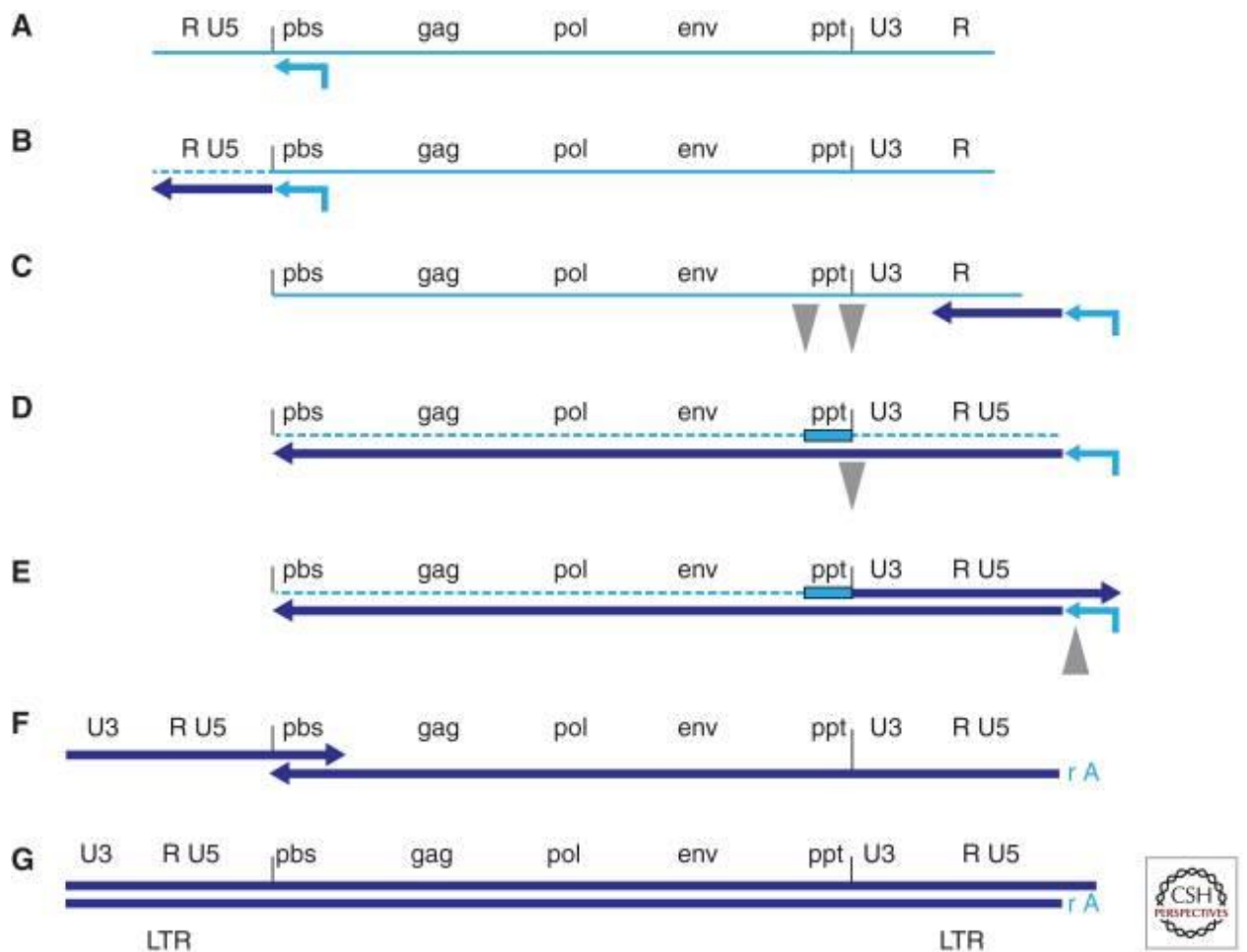
Joonis 1. HI-viiruse virioni ehitus. (Lau *et al.*, 2014, muudatustega)

Viiruse seondumine ja sisenemine rakku

HIV-1 retseptoriks on CD4 molekul, mis on T-helper lümfotsüütide pinnavalk. Samuti ekspresseerub CD4 makrofaagides, dendriitrakkudes ja astrotsüütides. Viiruse antiretseptoriks on glükoproteiin gp120, mille interaktsioon CD4 retseptoriga on peamine mehhanism rakule seondumiseks. CD4 on piisav HIV-1 rakkudele seondumiseks, kuigi rakku sisenemiseks on viirusel vaja abiretseptoreid: α -kemokiini retseptor CXCR4 ning β -kemokiini retseptor CCR5. Viiruse gp120 valgu seondumine CD4-ga põhjustab gp120 konformatsiooni muutuse, mis võimaldab abireseptori seondamist. gp120 interaktsioon koretseptoriga indutseerib gp41 konformatsiooni muutuse, mille tõttu vabaneb nn. fusioon-peptiidi alaregioon, mis interakteerub raku membraaniga ja algab fusioon ehk viiruse ja raku membraanide liitumine. Fusiooni kaudu siseneb virioni sisu raku tsütoplasmasse (Kwong *et al.*, 1998; Berger *et al.*, 1997; Chan ja Kim, 1998).

Pöördtranskriptsioon ja cDNA transport raku tuuma

Kuna HI-viiruse genoomiks on positiivselt polariseeritud üheaahelaline (+) RNA, esimeseks etapiks peale rakku sisenemist on selle konverteerimine komplementaarseks DNA-ks (cDNA) (vt. Joonis 2). Pöördtranskriptaasil (RT) on kaks ensümaatilist aktiivsust, mis on vajalikud DNA sünteesiks RNA matriitsil. Esimene on DNA polümeraas, mis on võimeline sünteesima DNA-d kas RNA või DNA matriitsil ning RNAas H, mis DNA-RNA heterodupleksis degradeerib RNA-d, v.a. polüpuriini plokid. RT vajab praimerit, milleks on tRNA, mis oma 3' otsaga paardub genoomiga praimerit seondumisregioonis (Joonis 2A). DNA sünteesi käigus moodustub DNA-RNA dupleks, mis on RNAas H substraadiks. RNAas H degradeerib RNA-d ja seega vabastab negatiivset DNA ahelat (Joonis 2B, 2D). Viiruse RNA otsad kujutavad endast korduvjärjestusi, mis toimivad sildadena: uuesti sünteesitud negatiivset DNA ahelat koos RT-ga kantakse üle matriitsi 3' otsale (Joonis 2C). Süntees jätkub kuni RNA ahela otsani. Polüpuriini plokid, mida RNAas H ei ole võimeline degradeerima on positiivse DNA ahela sünteesi praimeriks (Joonis 2E). Positiivse ahela elongatsioon kulgeb kuni negatiivse ahela otsani. tRNA primereid deleteeritakse. Positiivse DNA ahela 3' otsa jäävad 18 nukleotiidi, mis on komplementaarsed negatiivse DNA ahela 3' otsa 18 nukleotiidile, mis olid kopeeritud praimerit seondumise regioonist (Joonis 2E, 2F). Seega, pöördtranskribeerimise lõpus tekib kaheaahelaline DNA produkt, mis on pikem, kui viiruse genoomne RNA (Joonis 2G) (Knipe *et al.*, 2007; Hu ja Hughes, 2012).



Joonis 2. HI-viiruse pöördtranskriptsioon. (A) Helesinise värviga joon näitab HI-viiruse genoomset RNA-d. Helesinise noolega on tähistatud pöördtranskriptsiooni alguspunkt, milleks on praimeris seondumisregioon. Primeriks on tRNA. (B) Algab (-) DNA ahela süntees (märgistatud tumesinise joonega). DNA-RNA dupleksist RNA degradeerimine RNAas H poolt on märgistatud kriipsjoonega. (C) Esimene ahela ümberlülitus. (-) DNA ahelat koos pöördtranskriptaasiga kantakse üle ühe otsa korduvjärjestusest teise otsa korduvjärjestusele. See võimaldab jätkata (-) DNA ahela sünteesi. (D) (+) DNA ahela sünteesi praimeriks on polüpuriini plokk (ppt), mida RNAas H ei suuda degradeerida. (E) Algab (+) DNA ahela süntees, mis käib (-) DNA ahela otsani kuni on kopeeritud 18 nukleotiidi tRNA-d. Toimub tRNA praimeris eemaldamine. (F) Primeri eemaldamine RNAas H poolt annab võimaluse teiseks ahela ümberlülitamiseks. (G) Lõpp-etapiks on (+) DNA ahela elongatsioon ning pöördtranskriptsiooni tulemusena saadakse lineaarset kaheahelalist DNAd (Hu ja Hughes, 2012).

HI-viiruse genoomis on 9 geeni, mis kodeerivad 15 viiruse valku. Geenid on ümbritsetud identsete pikkade korduvjärjestustega (LTR, *Long Terminal Repeats*). Kolm geeni – *gag*, *pol* ja *env* – kodeerivad struktuurseid valke (MA, CA, NC, p6), ensüüme (PR, RT, IN) ning membraanseid glükoproteiine (TM, SU). Teistest geenidest HIV kodeerib reguleerivaid valke (Tat, Rev), ning abivalke (Vif, Vpr, Vpu/Vpx, Nef) (Li et al., 2015).

Pöördtranskriptaasil puudub vigade parandamisvõime, mis, koos sageda ahelate ümberlülitamisega pöördtranskriptsiooni jooksul ning koos viiruse kõrge replikatsiooni

kiirusega põhjustab väga geneetiliselt varieeruvate viiruspopulatsioonide teket. Peale pöördtranskriptsiooni sünteesitud cDNA assambleerub preintegratsiooni kompleksi (*PreIntegration Complex*, PIC). PIC koosneb viiruse valkudest (IN, MA, CA, Vpr) ja cDNast. PIC transporditakse peremehe raku tuuma, kus cDNA integreerub peremehe genoomi (Knipe et al., 2007; Hu ja Hughes, 2012).

Integratsioon peremehe genoomi

Retroviiruste replikatsiooni iseloomustav tunnus on cDNA insertsioon peremehe kromosoomi. Integreeritud cDNAd nimetatakse proviiruseks. Proviirus on matriitsiks viirusliku RNA sünteesiks ning cDNA jääb peremehe genoomi kuni raku surmani. Integratsiooni katalüüsib integraas. Lühidalt, IN lõikab 2-3 nukleotiidi viiruse cDNA mõlema ahela 3' otsast. cDNA ahela ülekandmiseks teeb IN lõiget järjestusest sõltumatult raku sihtmärk DNAs ning ühendab viiruse cDNA mõlemad 3' otsad raku DNA 5' otstega. Integratsiooni protsess lõpetatakse peremeesraku DNA reparatsiooni mehhanismiga, mis täidab lüngad (Craigie ja Bushman, 2012).

Viiruse geenide ekspressioon, RNA transportimine tuumast välja

Viiruse elutsükli järgnev etapp on HIV geenide ekspressioon, mis on reguleeritud transkriptsioonilisel ja posttranskriptsioonilisel tasandil, mida vahendavad Tat ja Rev valgud (Toro-Ascuy *et al.*, 2016). Täispika 9 kb mRNA sünteesi teostab peremehe raku RNA polümeraas II; sünteesitud mRNA on identne viiruse partiklist pärit genoomse RNA-ga. Kõige olulisemad reguleeritud alad on cDNA LTR järjestused, kus paiknevad enhaanseri ja promooteri saidid. LTR-idel on võime seonduda erinevaid rakulisi transkriptsioonifaktoreid (NFAT, NF- κ B), mis on vajalik efektiivse transkriptsiooni initsiatsiooni jaoks (Chaudhary *et al.*, 2016). Varajases geeniekspressiooni staadiumis läbib täispikk mRNA alternatiivset splaissingut, mille tulemusena tekivad täielikult splaissitud (1.8 kb), osaliselt splaissitud (4 kb) ning mittesplaissitud transkriptid. Täielikult splaissitud transkriptid kodeerivad Tat, Rev ja Nef valke. Osaliselt splaissitud transkriptide pealt transleeritakse Env, Vpu, Vif ja Vpr valke. Mittesplaissitud mRNA-d kasutatakse Gag ja Gag-Pol sünteesiks (Toro-Ascuy *et al.*, 2016).

Tat on transkriptsioonifaktor, mis reguleerib transkriptsiooni initsiatsiooni ja elongatsiooni seondudes mRNA 5' otsas oleva TAR (*Trans-Activation Response*) regioonile. See

seondumine on vahendatud tsükliin T-CDK9 kompleksi poolt. Samuti, reguleerib Tat valk ka paljude peremehe geenide ekspressiooni (Reeder *et al.*, 2015; Das *et al.*, 2011).

Mittesplaissitud ja osaliselt splaissitud mRNAde transporti tuumast välja teostab Rev valk. Rev valku transport tuuma toimub importiin- β seondumisel tema tuuma ekspordi signaaljärjestusele, ning Rev valk transporditakse tuuma Rev/importiin- β heterodimeerina. Tuumas Rev valk vabaneb, ning seondab RRE-sid (*Rev Response Element*) sisaldavaid mRNA-dele. Rev/RRE-RNA kompleks koos CRM1-ga (raku tuumne ekspordi faktor) ja Ran(GTP)-ga moodustavad funktsionaalse ekspordi kompleksi, mis väljub tuumapooride kaudu tsütoplasmasse. Tsütoplasmas toimub Ran(GTP) hüdroolüüs Ran(GDP)-ks, kompleks dissotsieerub ja mRNA vabaneb (Toro-Ascuy *et al.*, 2016; Knipe *et al.*, 2007).

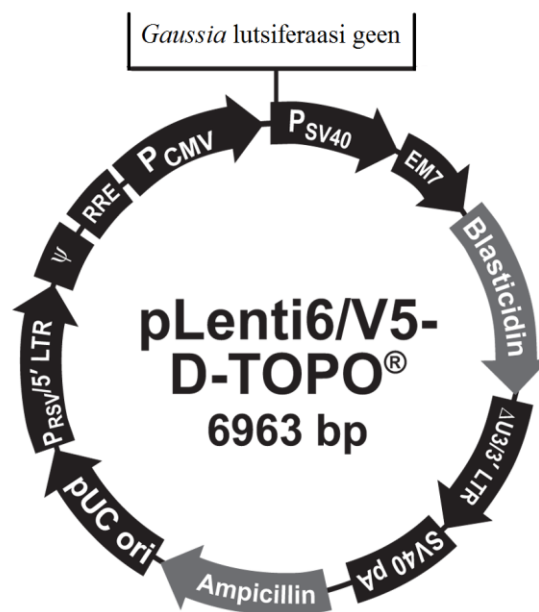
Viiruspartiklite kokkupanek, pungumine ja küpsemine

HI-viiruse gag valgud mängivad väga olulist rolli mitteinfektsiooniliste viirus-laadsete partiklite (VLP-de) moodustumisel virionide kokkupanemisel. Gag valke sünteesitakse eellasvalgust Pr55^{Gag}. Peale Pr55^{Gag} sünteesi suunatakse teda plasmamembraanile ning seal toimub partiklite moodustumine. Gag polüproteiini valk-valk interaktsioon ja samuti tema interaktsioon plasmamembraani ja viiruse genoomi vahel mängivad olulist rolli virionide moodustumisel. Virioni moodustumine ja pungumine membraanist toimub sünkroonselt. (Sundquist, Kräusslich, 2012; Knipe *et al.*, 2007). Virioni lipiidne membraan on pärit plasmamembraanist. Env glükosüleeritud valgu süntees toimub endoplasmaatilises retiikulumis (ER) tema eellasvalgust gp160. gp160 glükosüleeritakse kotranslatsiooniliselt, mille järgselt toimub oligomeriseerumine ER-is. gp160 transporditakse Golgi kompleksile, kus proteolüütilise lõikamise järel saadakse kahte membraanset glükoproteiini: TU (gp120) ning SU (gp41). Lõikamist teostab furiin või furiini-sarnane proteaas. gp160 lõikamine on vajalik HI-viiruse Env-vahendatud fusiooni aktiivsuseks ning viiruse infektsioonilisuse jaoks (Knipe *et al.*, 2007). Virioni kapsiidi lõplik valmimine leiab aset peale viiruse vabanemist rakust. Viirusliku proteaasi aktivatsioon viib Gag valgu lõikamiseni, mille tõttu muutub virionide morfoloogia, mis on vajalik infektsioonilisuseks. Peale seda, ribonukleoproteiin kondenseerub partikli keskele, kus seda ümbritsetakse ikosaedriline kestaga, mida moodustab CA valk (Sundquist, Kräusslich, 2012; Knipe *et al.*, 2007).

1.2 HIV viirus-laadsete partiklite kasutamine

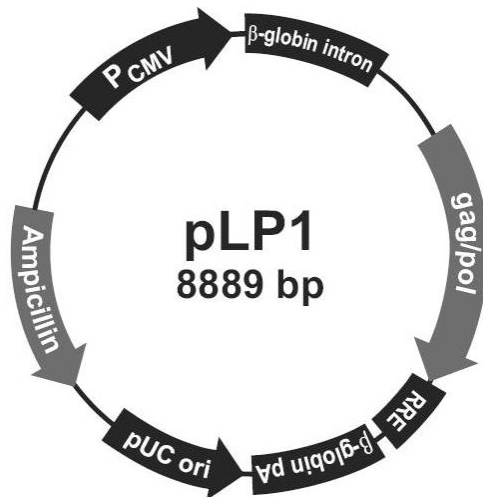
HIV viiruslaadsete partiklite (VLP-de) moodustamiseks on absoluutselt vajalik ainult Pr55^{Gag} eelvalgu ekspressioon (Knipe *et al.*, 2007). Mõnede viiruste struktuursed valgud omavad võimet iseeneslikult kokku pakkida hästi organiseeritud struktuurideks. Selliseid struktuure nimetatakse VLP-deks. VLP-de moodustamisel on võimalik sisestada võõraid epitoope. Kui VLP sisaldab üht või enam struktuurset valke, mis ei ole kodeeritud antud viiruse nukleiinhapete poolt, nimetatakse selliseid struktuure pseudotüpeeritud VLP-deks. Pseudotüpeeritud VLP-d säilitavad kõrget immunogeensust ja lisaks sellele, pseudotüpeerimisega on võimalik laiendada peremeesringi (Sanders, 2002; Lasickienė *et al.*, 2012). Kasutades lentiviiruse vektoreid, on võimalik *in vitro* või *in vivo* sisestada märklaudgeeni jagunevate ja mittejagunevate rakkude genoomi. Käesolevas töös oli kasutatud Invitrogen ViraPower™ Lentiviral Expression System. Süsteem on märgatavalt ohutum, kui katsete läbiviimine kasutades HI- viirust. HIV-1 VLPd on võimelised replitseeruma ja nad on infektsioonilised. Kuigi neil puudub võime toota uusi viiruslaadseid partikleid. Antud süsteemis kasutatav ekspressiooniplasmiid sisaldab tsütomegaloviiruse varajast promootorit, mis võimaldab saavutada meid huvitava geeni kõrget ekspressioonitaset (Life Technologies Corporation, 2010). Süsteem koosneb kolmest komponendist:

- pLenti- põhine süsteem sisaldab ekspressioonivektorit kuhu kloneeritakse markergeen. Käesoleva töö markergeeniks oli aerjalalise *Gaussia princeps* lutsiferaasi geen. Samuti, vektor sisaldab elemente, mis on vajalikud ekspressioonikonstrukti pakkimiseks virionidesse (vt. Joonis 3)

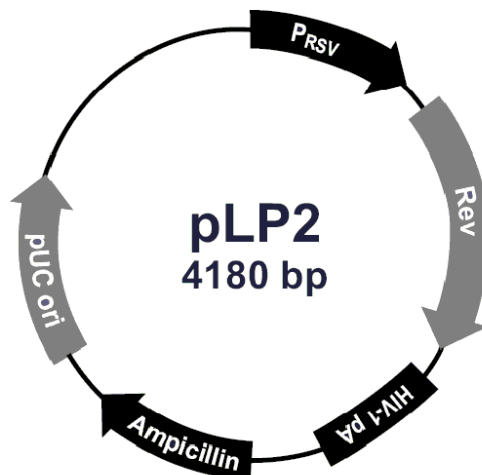


Joonis 3. pLenti6/V5-D-TOPO vektori kaart. P_{RSV} - Rous sarkoomi viiruse (*Rous sarcoma virus*, RSV) enhanser/promooter (võimaldab Tat-sõltumatu viiruse mRNA sünteesi); 5'LTR - HIV-1 lühendatud 5'LTR (võimaldab viiruse mRNA pakkimist ja pöördtranskribeerimist); ψ - HIV-1 pakkimissignaali (võimaldab vektori pealt sünteesitud RNA pakkimist); RRE - HIV-1 Rev vastuselement (võimaldab mittesplaissitud vektori mRNA Rev-sõltuvat transporti tuumast); CMV - inimese tsütomegaloviiruse (*Cytomegalovirus*,) varajane promooter (võimaldab huvipakkuva geeni kõrget ekspressioonitaset); SV40 - Simian viiruse 40 (*Simian virus 40*) varajane promooter ning origin (blastitsidiini resistentsusgeeni kõrge ekspressiooni tase ja episomaalne replikatsioon rakkudes, mis ekspresseerivad SV40 suurt T-antigeeni); sünteetiline prokarüootne EM7 promooter (blastitsidiini resistentsusgeeni ekspressioon *E. coli* rakkudes); Blastidicine - blastitsidiini resistentsuse geen (stabiilselt transdutseeritud imetajate rakkude selektsioon); ΔU3/3'LTR - HIV-1 lühendatud HIV-1 3'LTR (võimaldab viirusliku pakkimist, inaktiveerib 5'LTR-i, sisaldab polüadenüleerimissignaali); SV40pA - SV40 polüadenüleerimissignaali (tagab efektiivset transkriptsiooni terminatsiooni ja mRNAde polüadenüleerimist); Ampicillin - ampitsilliini resistentsusgeen (võimaldab plasmidi selektsiooni *E. coli* rakkudes), pUC - replikatsiooni origin (tagab kõrge-koopiarvuga replikatsiooni ja säilitamist *E. coli* rakkudes); *Gaussia* lutsiferaasi järjestus.

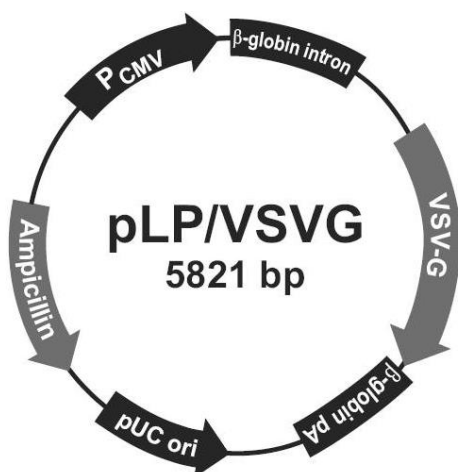
- 3 pakkimisplasmiidide segu—*The ViraPower™Packaging Mix*. Plasmiidideks on pLP1, pLP2, ning pLP/VSVG. Need plasmiidid sisaldavad struktuurseid ning replikatsiooniks vajalikke valke, mis on vajalikud lentiviirus-laadsete partiklite tootmiseks. Plasmiidid on näidatud joonistega ning joonise kirjelduses on selgitatud kõik plasmiidide komponendid (vt. Joonised 4, 5, 6).



Joonis 4. pLP1 plasmidi kaart. pCMV – Inimese tsütomegaloviiruse varajane promooter (tagab HIV-1 gag ja pol geenide ekspressiooni kõrget taset imetajate rakkudes); inimese β-globiini intron (gag ja pol geenide ekspressiooni tugevdamiseks imetajate rakkudes); gag/pol – HIV-1 gag ja pol kodeerivad järjestused.; RRE – HIV-1 Rev vastuselement (vajalik gag ja pol geenide Rev-sõltuvaks ekspressiooniks); β-globiin pA – inimese β-globiini polüadenüleerimissignaal (transkriptsiooni terminatsioon ning mRNA polüadenüleerimine); pUC ori – replikatsiooni origin (tagab kõrge-koopiaarvuga replikatsiooni ja säilitamist *E. coli* rakkudes); Ampicillin – ampitsilliini resistentsusgeen (selektiivsus).



Joonis 5. pLP2 plasmidi kaart. P_{RSV} – RSV enhanser/promooter (tagab kõrget Rev geeniekspressiooni); Rev – HIV-1 Rev lugemisraam (kodeerib Rev valku, mis indutseerib gag ja pol ekspressiooni ja soodustab mittesplaissitud viirusliku RNA ekspordi tuumast); HIV-1 pA – HIV-1 LTR polüadenüleerimissignaal (transkriptsiooni terminatsioon ning mRNA polüadenüleerimine); Ampicillin – ampitsilliini resistentsusgeen (selektiivsus); pUC ori – replikatsiooni origin (tagab kõrge-koopiaarvuga replikatsiooni ja säilitamist *E. coli* rakkudes).



Joonis 6. pLP/VSVG plasmidi kaart. P_{CMV} – Inimese CMV promooter (tagab kõrget vesikulaarse stomatiidi viiruse G glükoproteiini (*Vesicular stomatitis virus*, VSV) ekspressiooni imetajate rakkudes); inimese β-globiini intron (tugevdab VSV G glükoproteiini ekspressiooni); VSV-G glükoproteiin (võimaldab laia peremeesringiga pseudotüpeeritud retroviiruse produktsiooni); β-globiin pA – inimese β-globiini polüadenüleerimissignaal (transkriptsiooni terminatsioon ning mRNA polüadenüleerimine); pUC ori – replikatsiooni origin (tagab kõrgekoopiaarvuga replikatsiooni ja säilitamist *E. coli* rakkudes); Ampicillin – ampitsilliini resistentsusgeen (selektiivsus).

- 293FT rakuliin, mida kasutatakse optimaalseks VLP-de produktsiooniks. 293FT rakuliin on inimese embrüonaalsed neerurakud, mis stabiilselt ekspresseerivad Simian viiruse (SV40) suurt T-antigeeni. SV40 suure T-antigeeni ekspressioon on inimese tsütomegaloviiruse (*cytomegalovirus*, CMV) promooteri kontrolli all. SV40 suure T-antigeeni esinemine tagab stabiilset ja kõrget valguekspressiooni vektoritelt, mis sisaldavad SV40 *origin*-i (Life Technologies Corporation, 2010; Thermo Fisher Scientific Inc, 2015).

1.3 HIV inhibiitorid

Mittenukleosiidsed pöördtranskriptaasi inhibiitorid

Mittenukleosiidsed (*Non-Nucleotide Reverse Transcriptase Inhibitors*, NNRTI) ja nukleosiidsed/nukleotiidsed (*Nucleotide Reverse Transcriptase Inhibitors*, NRTI) pöördtranskriptaasi inhibiitorid mängivad olulist rolli HI-viiruse vastases teraapias. HAART teraapia koosneb tavaliselt kolmest ravimist, millest kaks on NRTI-d ning üks on kas NNRTI või proteaasi inhibiitor. Samuti kasutatakse ka kahte NRTI-d ja integraasi inhibiitorit (*Integrase strand-transfer inhibitor*, InSTI) või kahte NRTId ning proteaasi inhibiitorit (PI).

(Kwara *et al.*, 2005; Cory *et al.*, 2015). Tänapäeval on USA Toidu- ja Raviameti (*Food and Drug Administration Agency*, FDA) poolt on heaks kiidetud neli NNRTI-d: efavirenz (EFV), etravirine (ETR), nevirapine (NVP) ning rilpivirine (RPV) (AIDS info, 2017).

NNRTI-d seonduvad RT-le (kuid mitte aktiivsentrile) ja põhjustavad ensüümi konformatsioonilist muutust lukustades seda mitteaktiivsesse asendisse (Sluis-Cremer, 2014). Universaalset viiruse vastast ravimit pole. Inhibiitoritel on kindlaks määratud kontsentratsioon, mille juures on ainel viirusele inhibeeriv toime. Kui antiretroviirus-ravimi kontsentratsioon patsiendi veres on teatud tasemest madalam, aine võime inhibeerida viiruse replikatsiooni langeb. Selline olukord soodustab viiruse resistentsete tüvede teket antud aine suhtes. Resistentse tekkimisega kaasneb olukord, kui antud ravimit ei saa enam kasutada HI-viiruse infektsiooni ravimiseks (Cory *et al.*, 2015). Seega, on vaja pidevalt uurida uusi HI-viiruse vastaseid inhibiitoreid.

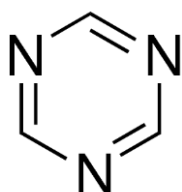
Uute potentsiaalsete inhibiitorite otsing

Üheks laialdaselt kasutatavaks meetodiks on sünteetiline orgaaniline keemia ja potentsiaalsete inhibiitorite HIV-vastase toime analüüs. Protsess algab virtuaalse raamatukogu loomisest ning ühendite farmakoloogiliste omaduste hinnangust. Kasutades virtuaalset või *in silico screening*-ut otsitakse ühendeid, millel on struktuursed sarnasused praegu kasutusel olevate inhibiitoritega. Järgmiseks sammuks on *docking* arvutianalüüs, millega on võimalik tuvastada, kas ühendid on võimelised siduma oma sihtmärki, näiteks HIV-1 pöördtranskriptaasi. Lõpuks valitakse ühendeid, millel on huvitav struktuur, on olemas struktuursed sarnasused kasutusel olevate inhibiitoritega, kõrge valk-ligand affiinsus. Parimaid ühendeid sünteesitakse, puhastatakse ning tehakse eksperimentaalsed katsed. Esialgu, leitakse potentsiaalsete inhibiitorite kontsentratsioone, mis ei ole inimese rakkudele toksilised. Seejärel analüüsitakse ainete inhibeeriv toime HIV-1 VLP-dele. Kui saavutatud tulemused on positiivsed, on vaja kindlaks teha, mis inhibiitoriga on tegemist. Selleks tehakse katseid *in vitro* puhastatud HIV ensüümidega (RT, IN, PR), kus tõestatakse, et tegemist on otsese toimiva ühendiga. Lõpliku tulemuse inhibeerimisvõime suhtes annavad katsed, milles on kasutatud infektsiooniline HI-viirus, mitte HIV-laadsed VLP-d. Kui selgub, et tegemist on otsese toimega viiruse ensüümi inhibiitoriga, siis on vajalik läbi viia katseid ka kliinilistest proovidest leitud resistentseid mutatsioone sisaldavate ensüümidega/VLP-dega. Ainult siis, kui katsete tulemuste põhjal on võimalik teha järeldusi, mis tüüpi potentsiaalse inhibiitoriga tegu on ja mis on ühendi inhibeerimismehhanismiks, minnakse loomkatsetesse, kus tehakse aine toksilisuse ja efektiivsuse analüüs. Uringute viimaseks etapiks on kliinilised katsed, mis

omaette jagunevad alametappideks. Kogu protsess võib heal juhul võtta aega 10-15 aastat või isegi rohkem (Barreiro *et al.*, 2007; Viira *et al.*, 2016).

Triaziinid

Triaziinid on heterotsükililiste orgaaniliste ühendite klass (vt. Joonis 7). Triaziinide benzeenituumas on kolm süsinikku asendatud lämmastikuga. Eelnevad uuringud näitasid, et diarüültriaziiinid (*diaryl triazines*, DATA) omavad tugevat mahasuruvat toimet nii tavalise, kui ka muteerunud HIV-1 vastu. Võrreldes käesolevate NNRTI-dega, DATA ja nende analoogid omavad paremaid füüsikalis-keemilisi omadusi (Mislak *et al.*, 2014; Jorgensen *et al.*, 2011). Hiljuti Tartu Ülikooli Keemia Instituudis (Uko Marani grupp) sünteesiti paneel sarnase struktuuriga ühendeid, mida testiti Tehnoloogiainstituudis potentsiaalsete HIV inhibiitoritena (Jorgensen *et al.*, 2011). Üks nendest ühenditest näitas kõrget aktiivsust nii rekombinantse RT suhtes, kui ka VLP-de ja infektsioonilise HIV-1 replikatsiooni inhibeerimisel. Käesoleva töö käigus uuritud triaziinid olid sünteesitud Gabriel Navarrete poolt, Universidad Autónoma del Estado de México. Struktuurid on näidatud allpool (vt. Materjal ja Metoodika, Tabel 1). Uued sünteesitud triaziinid omavad sarnast tuumastruktuuri Viira *et al.*, 2016 poolt kirjeldatud triaziinidega. Alfonso García-Sosa (TÜ Keemia Instituut) poolt tehtud *docking* arvutianalüüs näitas, et sünteesitud triaziinid suure tõenäosusega võivad seonduda HIV-1 pöördtranskriptaasiga.



Joonis 7. S-Triaziini struktuur (Sigma-Aldrich).

2. EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1 Uurimistöö eesmärgid

- 1) Valmistada HIV-1 VLP-sid kasutades ViraPower™Lentiviral Expression System
- 2) Uurida triaziinide tsütotoksilisust U2OS rakkudele kasutades MTT analüüsi meetodit
- 3) Uurida triaziinide inhibeerivat toimet HIV-1 VLP-dele
- 4) Võrrelda uudsete inhibiitorite toimet praegusel kasutatava inhibiitoriga

2.2 Materjal ja metoodika

Rakuliinid ja söötmed

Lentiviiruse VLP-de tootmiseks kasutati 293FT (inimese embrüonaalsed neerurakud) rakuliin. 293FT rakuliini kasvatati Gibco® DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, Naxo) täissöötmes, mis sisaldab 10% veiseloote seerumit (*fetal bovine serum*, FBS); 1% penitsilliin-streptomütsiini (100x), 0.1 mM MEM (*Eagle's minimum essential medium*) asendatavaid aminohappeid (100x), 6 mM MEM naatrium püruvaati (100x).

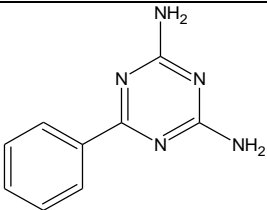
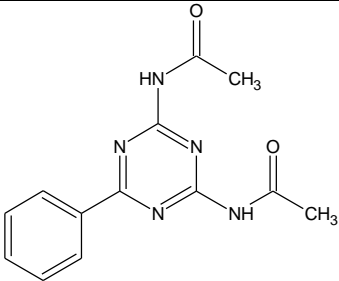
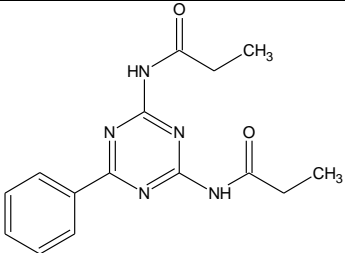
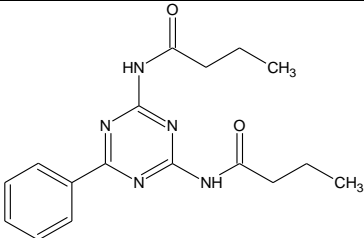
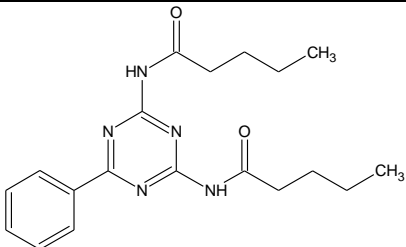
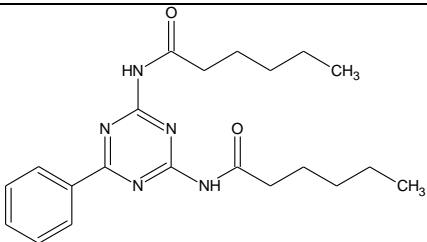
Triaziinide inhibeerimisvõime oli uuritud kasutades VLP-dega nakatatud U2OS (inimese osteosarkoomi rakud) rakuliini. U2OS rakke kasvatati Gibco® IMDM (*Iscove's modified Dulbecco's medium*, Naxo) täissöötmes, mis sisaldab 10% veiseloote seerumit ning 1% penitsilliin-streptomütsiini.

Kõiki rakke kasvatati 37°C juures ning 5% CO₂ atmosfääris.

Triaziinid

Allpool toodud tabelis on näidatud uurituid ühendite nimetused, struktuurid, molekulmassid, lahustid ning Glide XP skoorid (vt. Tabel 1). Glide XP on programm, mis hindab valk-ligand seondumisvõimet. Tänu sellele programmile saab eristada aktiivseid, ehk need mis seonduvad tugevasti, mitteaktiivsetest ühenditest. Glide XP skoor näitab eeldatavat seondumise vaba energiat (kcal/mol) (Schrödinger)

Tabel 1. Triaziinide struktuurid

Kood	Struktuur	Molaarmass (g/mol)	Lahusti	Glide XP (kcal/mol)
TRZ-0		187.2	DMSO	-7.05
TRZ-1		271.27	DMSO	-7.38
TRZ-2		299.33	DMSO	-8.29
TRZ-3		327.38	DMSO	-8.51
TRZ-4		355.43	DMSO	-8.54
TRZ-5		383.49	DMSO	-9.02

VLP-de tootmine ja kogumine

Päev enne transfektsiooni plaaditi 293FT rakke DMEM antibiootikumivaba söötmes nii, et transfektsiooni päeval oleks rakkude konfluentsus 10 cm läbimõõduga Petri tassil 90-95%.

VLP-de tootmiseks kasutati *ViraPowerTM Lentiviral Expression System* („Invitrogen“).

Transfektsiooni päeval tehti pLP1, pLP2, pLP-VSVG, pLenti-Gluc plasmiidide segu. Iga plasmidi võeti 3 µg ning segusse lisati 1.5 ml Opti-MEM® seerumivaba söödet. Eraldi tuubis segati kokku 36 µl *LipofectamineTM2000* („Invitrogen“) ja 1.5 ml Opti-MEM® seerumivaba söödet. *LipofectamineTM2000* ning Opti-MEM® sööde segu inkubeeriti toatemperatuuril 5 minutit. Peale 5 minutilist inkubeerimist segati plasmiidide-söötme segu kokku *LipofectamineTM2000* söötme seguga ning inkubeeriti toatemperatuuril 20 minutit, selleks, et lasta DNA-*LipofectamineTM2000* kompleksitel moodustuda. Samal ajal kui inkubeeriti plasmiidide ja *LipofectamineTM2000* segu, eelneval päeval ettevalmistatud rakkude tassilt eemaldati söödet ning rakke pesti PBS-iga. Seejärel eemaldati rakke tassilt 0.25% trüpsiini/EDTA (Smart Media, Naxo) seguga, ning rakke koguti 15 ml tuubi, kus oli 5 ml DMEM antibiootikumivaba söödet. Rakke sadestati tsentrifuugimisel (5 min, 1500x g „Eppendorf Centrifuge 5810R“). Peale tsentrifuugimist rakke plaaditi uuele 10 cm Petri tassile ning lisati tilkade kaupa DNA-*LipofectamineTM 2000* segu. Tass inkubeeriti üleöö inkubaatoris 37°C juures 5% CO₂ sisaldusega.

Järgmisel päeval vahetati rakkudel söödet, asendades DNA-*LipofectamineTM2000* komplekse sisaldavaid söödet värske antibiootikumivaba DMEM söötmega, ning rakke inkubeeriti 37°C juures 5% CO₂ sisaldusega.

72 tundi peale transfektsiooni koguti VLP-sid sisaldavat söödet ning tsentrifuugiti 4°C juures („Eppendorf Centrifuge 5810R“) 30 minutit, 1500x g, et eemaldada rakke. Supernatant kanti üle ultratsentrifuugi tuubi („Beckman“ 19×89 mm) ja ultratsentrifuugiti 4°C juures, 92 500g („Beckman Coulter OptimaTM L-90K Ultracentrifuge“) 3 tundi. Seejärel aspireeriti söödet, ning VLP sademele lisati 100 µl TNE (50 mM Tris (pH 7,5), 100 mM NaCl, 0,5 mM EDTA) puhvrit. VLP-sid hoiti üleöö 4°C juures, siis alikvooditi 10 µl kaupa ning hoiti -80°C juures.

VLP-de tiitri määramine

VLP-de tiitri määramiseks valmistati VLP-de kümnekordseid lahjendusi (10^{-2} – 10^{-7}) seerumivabas IMDM nakatussöötmes (1% penitsilliin-streptomütsiin, polübrein kontsentratsiooniga 6 µg/ml). 12-augulisel plaadil kasvatatud 90-100% konfluentsusega U2OS

rakkudele lisati 150 µl VLP-de lahjendusi. Katse oli tehtud kahes korduses. VLP-dega nakatatud rakke inkubeeriti 1 tund 37°C 5% CO₂ tingimustes, õrnalt segades plaati iga 10 minuti jooksul. Peale inkubeerimist lisati rakkudele 1 ml (1 augu kohta) IMDM täissöödet. Plaat inkubeeriti üleöö 37°C 5% CO₂ tingimustes. Teisel päeval vahetati söödet värske IMDM täissöötme peale. Kolmandal päeval vahetati söödet värkse IMDM täissöötme peale, mis sisaldas blastitsidiini lõppkontsentratsiooniga 5 µg/ml. Seejärel vahetati söödet uue blastitsidiini sisaldava IMDM täissöötme peale iga 3 päeva tagant. 14. päeval (12 päeva peale selektsiooni) eemaldati rakkudelt söödet ning pesti 2 korda PBS-iga, lisati rakkudele kristallviolett-fikseerimislahust (0,25% kristallviolett ("Merck"), 1,85% formaldehüüd, 10% etanool, 35 mM trishüdrosümetüül-aminometaan (Tris), 0,5% CaCl₂). Plaat inkubeeriti 30 minutit toatemperatuuril ning seejärel pesti kristallviolett-fikseerimislahust veega. Värvitud blastitsidiinile resistentseid kolooniaid loeti kokku ning arvutati VLP-de tiitrit ühikutes kolooniaid moodustavad ühikud (*colony forming unit*) ühe milliliitri kohta (cfu/ml).

Triaziinide tsütotoksilisuse määramine MTT reagentiga

Valmistati 96 augulise plaati. Iga auk sisaldas 7×10^3 U2OS rakke ning 200 µl IMDM täissöödet. Järgnevalt rakkudele lisati triaziine kontsentratsioonidega 500 µM, 50 µM, 5 µM ja 0.5 µM. Iga kontsentratsiooniga katse oli tehtud kolmes korduses. Kontrolliks olid rakud, millele oli lisatud 0.5% DMSO (dimetüülsulfoksiid, *dimethyl sulfoxide*). Taustaks oli võetud IMDM täissööde ilma rakkudeta. Rakud inkubeeriti ühenditega 48 tundi 37°C juures 5% CO₂ sisaldusega. 48 tundi möödudes lisati rakkudele 10 µl MTT (3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium Bromide, *Thiazole Blue*) reagenti ning inkubeeriti 37°C juures, 5% CO₂ juuresolekul 2 tundi. Seejärel eemaldati söödet ning rakkudele lisati 100 µl DMSO-d. Plaat inkubeeriti 15 minutit toatemperatuuril pidevalt loksutades. Järgnevalt, mõõdeti optilist tihedus 540 nm juures kasutades Tecan Sunrise aparati, Magellan™ - Data Analysis Software.

Gaussia lutsiferaasi ekspressiooni kvantifitseerimine

24-augulistel plaatidel kasvatati U2OS rakke IMDM täissöötmes 90-100% konfluentsuseni. Rakke pesti PBS-iga, lisati rakkudele 100 µl nakatamissegu: IMDM seerumivaba nakatamissööde, VLP-d (30 cfu augu kohta), DMSO-s lahustatud triaziinid. Ühendite kontsentratsioonide vahemik oli määratud eelnevalt tehtud tsütotoksilisuse analüüsi baasil. Ühendeid lahjendati alustades maksimaalsest mitte-toksilisest kontsentratsioonist allapoole.

Kontrolliks võeti rakke, mis olid töödeldud 0.5% DMSO-ga. Positiivseks kontrolliks VLP-de inhibeerimiseks kasutati NNRTI preparaati nevirapiini (1 μ M), mida kasutatakse HAART teraapia osana. Lisaks oli katsesse võetud ka obatoklaks (*Obatoclax*, *OLX*) (1 μ M). Nakatatud rakke inkubeeriti 1 tunni jooksul 37°C juures 5% CO₂ sisaldusega ja loksutati õrnalt iga 10 minutit tagant. Ühe tunni möödudes rakkudele lisati IMDM täissöödet, mis sisaldas vastavate kontsentratsioonidega triaziine või DMSO-ga. Seejärel, inkubeeriti plaate 48 tundi 37°C juures 5% CO₂ sisaldusega.

48 tundi möödudes rakkudelt eemaldati söödet, pesti kaks korda PBS-iga ning lüüsiiti rakud, lisades neile 100 μ l 1 \times LALB puhvrit (*Renilla* Luciferase Assay Lysis Buffer, *Renilla* Luciferase Assay System Kit, „Promega“). Plaate inkubeeriti toatemperatuuril 30 minutit, aeg-ajalt loksutades. Lüsaat koguti plaatidelt 1,5 ml tuubidesse ning tsentrifuugiti 4°C 13200x g (‘‘Eppendorf Centrifuge 5415R’’) 1 minuti jooksul. 4 μ l saadud rakulüsaadile lisati 20 μ l 1 \times *Renilla* Luciferase Assay substraati ning lutsiferaasi aktiivsust mõõdeti *Glomax 20/20* („Promega“) luminomeetri abil.

Totaalse valguhulga määramine

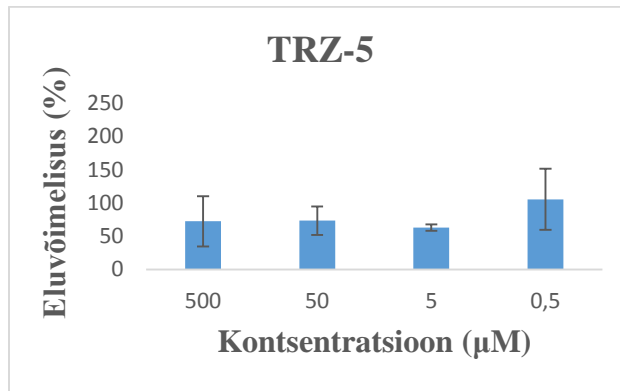
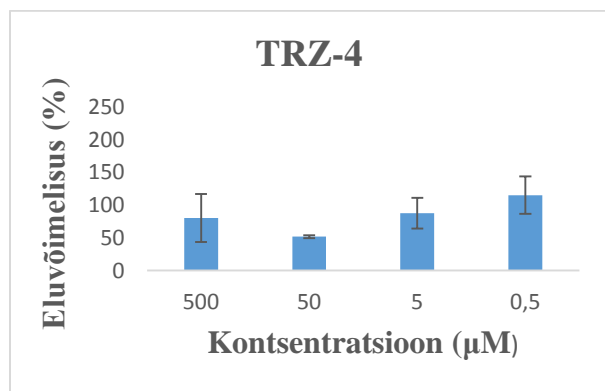
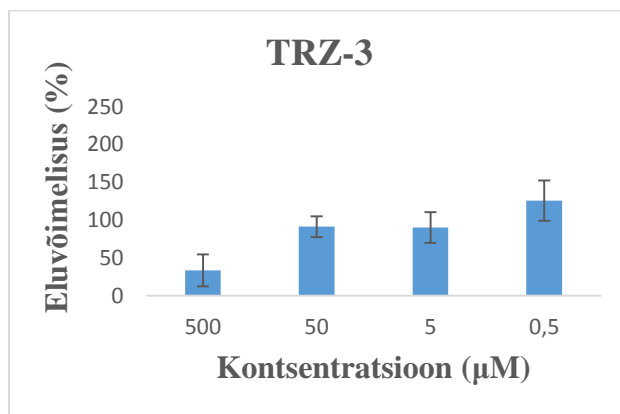
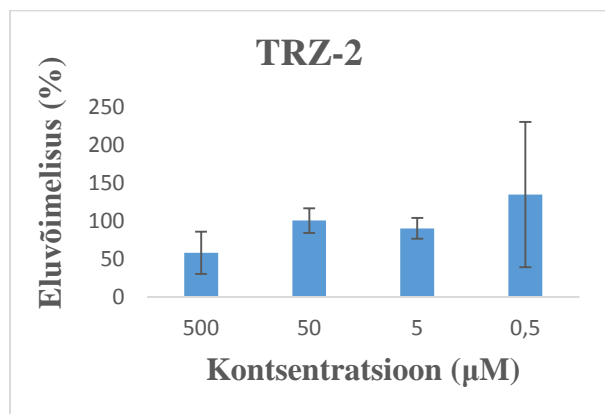
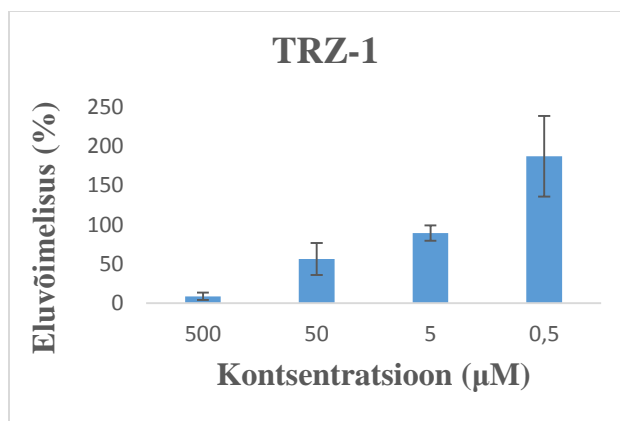
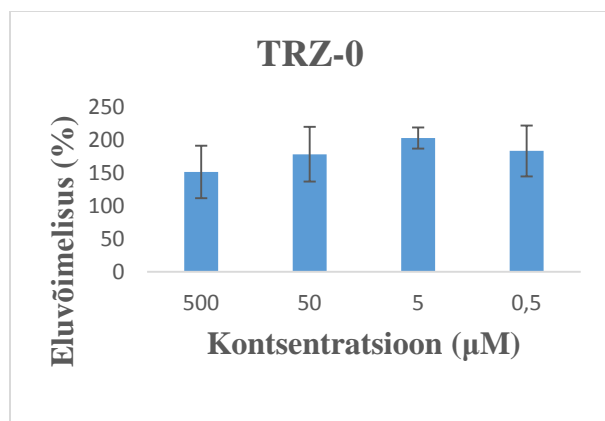
2 μ l lüsaadile lisati 318 μ l vett ning 80 μ l 5x *Bio-Rad Bradford Protein Assay* reagenti. 200 μ l segust kanti üle mikrotiiterplaadile („Nunc“, Maxi Sorp). Optilist tihedust mõõdeti 595 nm juures *Tecan Sunrise* aparaadiga. Kalibreerimiskõvera, mille järgi arvutati totaalse valgusisaldust proovis, koostamiseks kasutati BSA (*bovine serum albumin*) kindlate kontsentratsioonidega standardeid.

3. TULEMUSED JA ARUTELU

3.1 Triaziinide tsütotoksilisuse analüüs

Kuna tegemist oli uuete ainetega, mille bioloogiliste omaduste kohta informatsiooni ei ole, esimeseks etapiks oli vaja leida ühendite kontsentratsioonid, mis ei ole rakkudele toksilised. Selleks kasutati MTT reagentil põhineva analüüsi. Eluvõimelised, aktiivse metabolismiga rakud konverteerivad MTT reagenti formazaaniks, mis on tuvastatav tänu oma lillale värvile, mille intensiivsust määratakse mõõtes optilist tihedust lahuses. Vastupidisel juhul, kui rakud on juba surnud, ei ole nad võimelised konverteerima MTT reagenti formazaaniks ning värv ei ole tuvastatav. Tänu sellele värvireaktsioonile antud analüüs annab lihtsat võimalust analüüsida ühendite tsütotoksilisust kasutades optilise tiheduse mõõtmist.

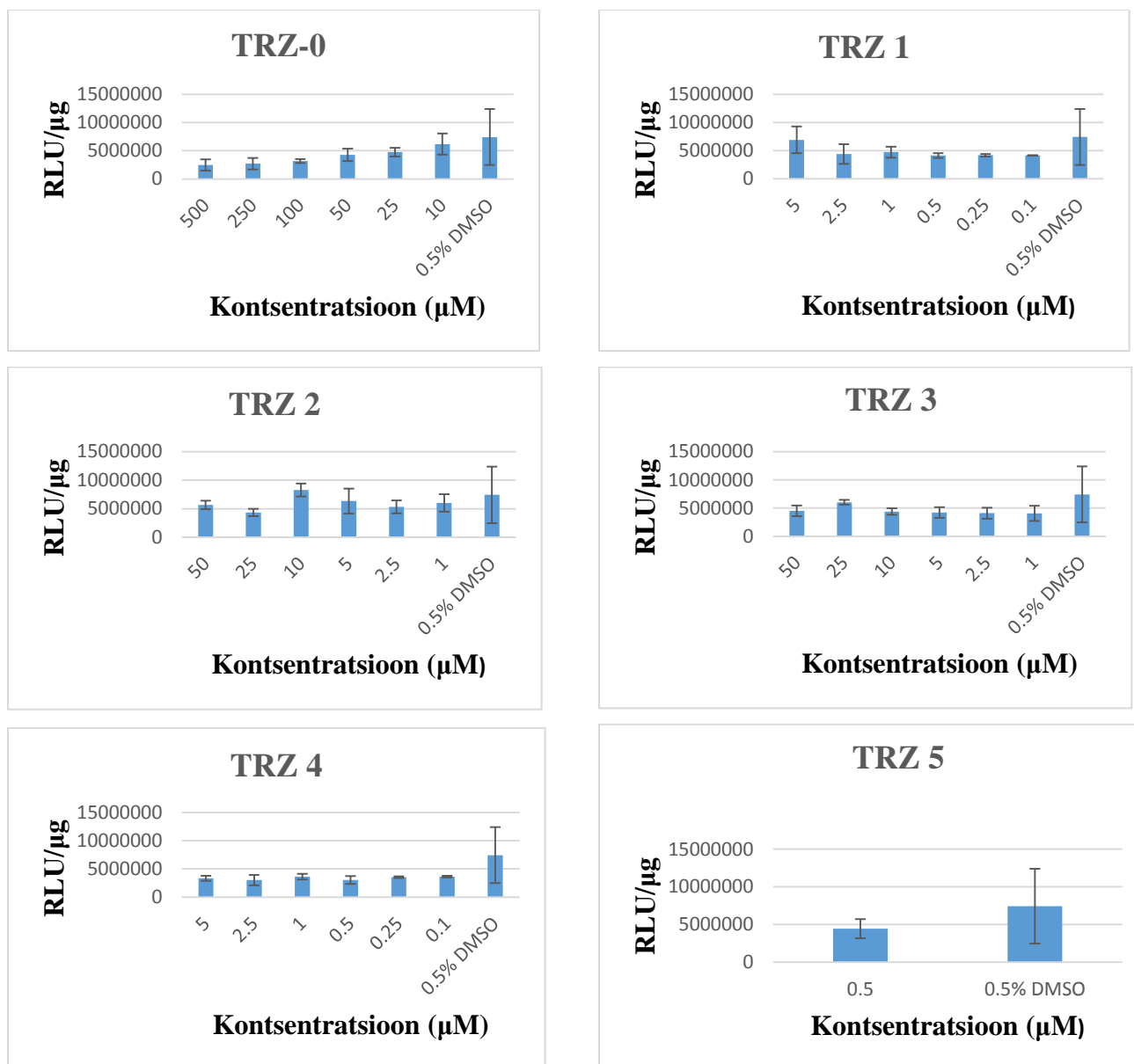
Antud ühendite tsütotoksilisuse hindamiseks olid võetud ühendite kontsentratsioonid 500 μM , 50 μM , 5 μM , 0.5 μM . Kontrolliks olid rakud ilma ühenditeta ning taustaks oli võetud sööde ilma rakkudeta. Tulemusena olid saadud kontsentratsioonid, mis ei ole rakkudele toksilised. Rakkudele mittetoksilised kontsentratsioonid olid valitud kontrolli suhtes, milleks olid rakud 0.5% DMSO sisaldusega, kuna rakud, millele olid lisatud triaziinid sisaldasid DMSO-d samas kontsentratsioonis. 0.5% DMSO sisaldusega rakud võeti arvesse kui 100% eluvõimelisusega rakud, triaziinidega töödeldud rakkude eluvõimelisus oli määratud protsentides kontrolliks kasutatud rakkude suhtes. Kui rakkude eluvõimelisus on rohkem kui 80% kontrolli suhtes, järeldati, et kontsentratsioon ei ole rakkudele toksiline. TRZ-0 ühendi jaoks oli selliseks kontsentratsiooniks 500 μM , TRZ-1 jaoks 5 μM , TRZ-2 ja TRZ-3 jaoks 50 μM , TRZ-4 jaoks 5 μM , ning TRZ-5 jaoks 0.5 μM . Tulemused on näidatud joonisel 8.



Joonis 8. Triaziinide tsütotoksilisuse määramine MTT reagenti abil. X-teljel on näidatud ühendite kontsentratsioonid (μmol/l) ja y-teljel on näidatud eluvõimelisus protsentides. Protsendid on arvutatud kontrolli suhtes. Kontrolliks on rakud, millele oli lisatud 0.5% DMSO-d. Näidatud on veapiirid, mis arvutati kolme paralleelse katse põhjal.

3.2 Triaziinide inhibeeriva toime analüüs

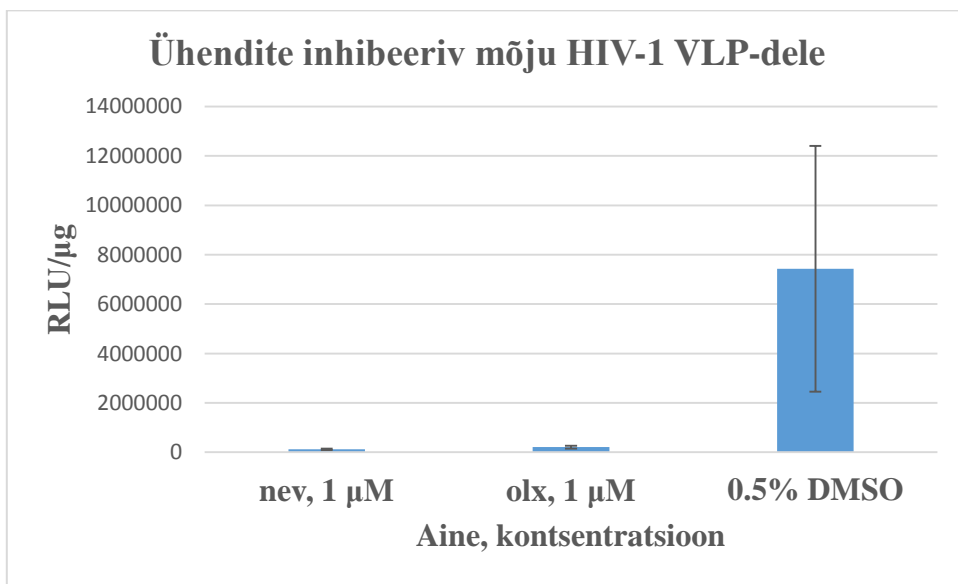
VLP-d sisaldasid markergeeni, milleks oli *Gaussia* lutsiferaas. *Gaussia* lutsiferaasi markergeen võimaldas uurida ning analüüsida triaziinide inhibeerimisvõimet. U2OS rakud nakatati VLP-sid ning triaziine sisaldava nakatussöötmega, lüüsi 48 tundi möödudes ning mõõdeti lutsiferaasi aktiivsust. Lutsiferaasi aktiivsus on otseses sõltuvuses VLP-dega nakatatud rakkude arvust, ehk mida kõrgem aktiivsus, seda väiksem on ühendi inhibeerimisvõime. Tulemuste normaliseerimiseks oli määratud rakkude totaalse valgu sisaldus proovides. Totaalse valgu sisaldust teadmata ei ole võimalik teha järeldusi ühendite inhibeerimisvõimet sellepärast, et igas lüsaadis sisalduv rakumass võib olla erinev. See võib olla seotud nii pipeteerimisveaga rakkude külvamise hetkel, kui ka ühendite toksilise toimega. Kui ühend mõjub rakkudele tsütotoksiliselt, siis rakud surevad ning ei suuda toota marker-valku isegi siis, kui nad on nakatunud. Seda võib eksklikult tõlgendada inhibeeriva efektina. Totaalse valgu määramine võimaldab normaliseerida lutsiferaasi aktiivsust rakkumassile lüsaadis ning sellega vätida tulemuste valeinterpreteerimist. Ühendite inhibeerimisvõime erinevate kontsentratsioonide puhul on toodud Joonisel 9. Kõikide triaziinide hulgas paremat tulemust näitas ühend TRZ-0, mis oli ka ühtlasi ka kõige madalama tsütotoksilisusega. TRZ-0 ühendi inhibeerimisvõime oli kõige suurem ja oli näha ka sõltuvust doosist. Kuigi antud efekt ei olnud väga tugev, kuna ka oma maksimaalses kontsentratsioonis 500 μM saavutas TRZ-0 vaid 3-kordest mahasurumist võrreldes kontrolliga. Lisaks, kontsentratsioon 500 μM on liiga kõrge selleks, et edasi uurida seda ühendit. TRZ-4 oli teise parema tulemusega ühend, kuigi ei näidanud sõltuvust doosist. Ülejäänud ühendite tulemused on kõikuvad.



Joonis 9. Ühendite inhibeeriv mõju HIV VLP-dele. Inhibeerimisvõime oli uuritud analüüsides markervalgu *Gaussia* lutsiferaasi ekspressiooni U2OS rakkudes. Lutsiferaasi aktiivsus oli normaliseeritud totaalse valgu sisaldusele rakulüsaatides. Näidatud on veapiirid, mis on saadud kolmest paralleelsest katsest.

Kontrolliks oli tehtud vastav katse ka praegu kasutusel oleva HIV-1 pöördtranskriptaasi inhibiitoriga nevirapiiniga (Joonis 10). Katse andis oodatud tulemuse – nevirapiin praktiliselt täielikult surus maha VLP-de replikatsiooni. Sama katset tehti kasutades veel ühte ainet, mille efektiivsus oli hiljuti näidatud alfa- ja flaviviiruste inhibeerimisel (Varghese *et al.*, 2017; Kuivanen *et al.*, 2017). Obatoklaks blokeerib endosoomide hapestumist ja sellega blokeerib

paljude endotsütoosi kasutatavate viiruste sisenemist rakkudesse. Kuna antud töö jaoks valmistatud HIV-1 VLP-d olid pseudotüpeeritud VSV G glükoproteiiniga, kasutavad VLP-d rakku sisenemiseks endosoome. Katsesse otsustati lisada ka obatoklaksi, kuna teoreetiliselt peab ta inhibeerima VLP-sid. Tulemusena (Joonis 10) meie oletus leidis tõestust, kuna obatoklaks efektiivselt inhibeeris HIV-1 VLP-sid – nevirapiiniga samas suurusjärgus.



Joonis 10. Nevirapiini ja obatoklaksi inhibeeriv mõju HIV VLP-dele. Näidatud on nevirapiini ja obatoklaksi Gaussia lutsiferaasi aktiivsuse mõõtmise tulemused, mis on normaliseeritud totaalse valgusisaldusele rakulüsaatides. Näidatud on veapiirid, mis on saadud kolmest paralleelsest katsest

Kokkuvõte

Inimese immuunpuudulikkuse viirust avastati 1983. aastal. HIV põhjustab AIDS-i ning on tänapäeval tõsine tervishoiu probleem. Praegu puudub ravim, mis võimaldaks viiruse täielikku kõrvaldamist inimese organismist, kuid on olemas viiruse-vastane teraapia, mis hoiab viiruse kontsentratsiooni kontrolli all ja väldib AIDS-i väljakujunemist. Probleemiks on viiruse kõrge mutatsiooni kiirus ning kiire resistentsuse teke ravimite suhtes. Sellepärast eksisteerib pidev vajadus uute ravimikandidaatide üle.

Käesoleva töö eesmärk oli uurida kuue uue sünteetilise ühendi inhibeerimisvõimet kasutades ohutut katsesüsteemi, mis põhineb HIV-1 viiruslaadsetel partiklidel. Ühendid olid sünteesitud Gabriel Navarrete poolt, Universidad Autónoma del Estado de México ning nende bioloogiliste omaduste kohta informatsioon puudub. Esiteks, oli vaja leida ühendite kontsentratsioonid, mis ei ole rakkudele toksilised. Teiseks, oli vaja uurida ühendite inhibeerimisvõimet, mida hinnati markergeeni ekspressioonitaseme järgi ning võrrelda praegu kasutusel oleva HI-viiruse vastase ravimi nevirapiiniga.

Tulemuste põhjal tehti järgnevad järeldused. Ühend TRZ-0 näitas doosist sõltuvat VLP-de inhibeerimist, kuigi ka maksimaalsel mittetoksilisel kontsentratsioonil saavutas vaid ligi 3-kordest mahasurumist. Kuigi ühendit TRZ-0 ei saa nimetada potentsiaalseks HI-viiruse ravimikandidaadiks, tulevikus on võimalik TRZ-0 struktuuri keemiliselt optimeerida ja korrata analüüsi.

Summary

Inhibition of HIV-1 virus-like particles with triazine-based compounds

Tatjana Pungert

Human immunodeficiency virus was discovered in 1983. HIV infection causes AIDS. Nowadays HIV infection is a major health problem. Currently, there is no cure against HIV infection; although with antiretroviral therapy it is possible to hold the viral load under control and prevent the development of AIDS. Nonetheless, the virus has high mutation speed and resistance against the available drugs emerges frequently. This is the reason why there is a constant need for new antiretroviral drugs.

The aim of this study was to evaluate the inhibitory effect of six novel triazine compounds using the safe system – HIV-1-based viral like particles expressing *Gausiia* luciferase as a reporter. The chemical compounds all containing a triazine core were synthesized by Gabriel Navarrete in UAEM, Mexico. First, it was necessary to find concentrations, which are not toxic for cells. Second, the inhibitory effects of compounds were tested by assaying marker gene expression and were compared to approved reverse transcriptase inhibitor nevirapine.

Based on the results, the following conclusions were made. TRZ-0 compound showed the dose-dependent inhibition of VLPs. Though, its effect was very mild – even at the maximum non-toxic concentration TRZ-0 compound reached only three-fold inhibition.

KASUTATUD KIRJANDUS

1. Barreiro, G., Kim, J. T., Guimarães, C. R. W., Bailey, C. M., Domaoal, R. A., Wang, L., ...Jorgensen, W. L. (2007). From Docking False-Positive to Active Anti-HIV Agent. *Journal of Medicinal Chemistry*, 50(22), 5324–5329.
2. Berger, E. A., Murphy, P. M., & Farber, J. M. (1999). Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. *Annual review of immunology*, 17(1), 657-700.
3. Briggs, J. A., Wilk, T., Welker, R., Kräusslich, H. G., & Fuller, S. D. (2003). Structural organization of authentic, mature HIV- 1 virions and cores. *The EMBO journal*, 22(7), 1707-1715.
4. Chan, D. C., & Kim, P. S. (1998). HIV entry and its inhibition. *Cell*, 93(5), 681-684.
5. Chaudhary, P., Khan, S. Z., Rawat, P., Augustine, T., Raynes, D. A., Guerriero, V., & Mitra, D. (2015). HSP70 binding protein 1 (HspBP1) suppresses HIV-1 replication by inhibiting NF- κ B mediated activation of viral gene expression. *Nucleic acids research*, gkv1151.
6. Cory, T. J., Midde, N. M., Rao, P. S. S., & Kumar, S. (2015). Investigational reverse transcriptase inhibitors for the treatment of HIV. *Expert opinion on investigational drugs*, 24(9), 1219-1228.
7. Costin, J. M. (2007). Cytopathic mechanisms of HIV-1. *Virology journal*, 4(1), 100.
8. Craigie, R., & Bushman, F. D. (2012). HIV DNA integration. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2: a006890.
9. Das, A. T., Harwig, A., & Berkhout, B. (2011). The HIV-1 Tat protein has a versatile role in activating viral transcription. *Journal of virology*, 85(18), 9506-9516.
10. Hu, W. S., and S. H. Hughes. "HIV-1 reverse transcription. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2: a006882." (2012).
11. Jorgensen, W. L., Bollini, M., Thakur, V. V., Domaoal, R. A., Spasov, K. A., & Anderson, K. S. (2011). Efficient discovery of potent anti-HIV agents targeting the Tyr181Cys variant of HIV reverse transcriptase. *Journal of the American Chemical Society*, 133(39), 15686-15696.
12. Knipe, D. M., Howley, P. M., Griffin, D. E., Lamb, R. A., Martin, M. A., Roizman, B., & Straus, S. E. (2007). HIVs and Their Replication, p. 2127-2129, 2145-2152, 2152-2153, 2161-2163. Fields Virology, Fifth edition, Volume Two, Philadelphia.

13. Kuivanen, S., Bespalov, M. M., Nandania, J., Ianevski, A., Velagapudi, V., De Brabander, J. K., ... & Vapalahti, O. (2017). Obatoclax, saliphenylhalamide and gemcitabine inhibit Zika virus infection in vitro and differentially affect cellular signaling, transcription and metabolism. *Antiviral research*, 139, 117-128.
14. Kwara, A., Flanigan, T. P., & Carter, E. J. (2005). Highly active antiretroviral therapy (HAART) in adults with tuberculosis: current status. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 9(3), 248-257.
15. Kwong, P. D., Wyatt, R., Robinson, J., Sweet, R. W., Sodroski, J., & Hendrickson, W. A. (1998). Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature*, 393(6686), 648-659.
16. Lasickienė, R., Gedvilaite, A., Norkiene, M., Simanaviciene, V., Sezaite, I., Dekaminaviciute, D., ... & Zvirbliene, A. (2012). The use of recombinant pseudotype virus-like particles harbouring inserted target antigen to generate antibodies against cellular marker p16INK4A. *The Scientific World Journal*, 2012.
17. Lau, C. Y., Maldarelli, F., Eckelman, W. C., & Neumann, R. D. (2014). Rational development of radiopharmaceuticals for HIV-1. *Nuclear medicine and biology*, 41(4), 299-308.
18. Li, G., Piampongsant, S., Faria, N. R., Voet, A., Pineda-Peña, A. C., Khouri, R., ... & Theys, K. (2015). An integrated map of HIV genome-wide variation from a population perspective. *Retrovirology*, 12(1), 18.
19. Mislak, A. C., Frey, K. M., Bollini, M., Jorgensen, W. L., & Anderson, K. S. (2014). A mechanistic and structural investigation of modified derivatives of the diaryltriazine class of NNRTIs targeting HIV-1 reverse transcriptase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1840(7), 2203-2211.
20. Reeder, J. E., Kwak, Y. T., McNamara, R. P., Forst, C. V., & D'Orso, I. (2015). HIV Tat controls RNA Polymerase II and the epigenetic landscape to transcriptionally reprogram target immune cells. *eLife*, 4, e08955.
21. Sanders, D. A. (2002). No false start for novel pseudotyped vectors. *Current opinion in biotechnology*, 13(5), 437-442.
22. Sluis-Cremer, N. (2014). The emerging profile of cross-resistance among the nonnucleoside HIV-1 reverse transcriptase inhibitors. *Viruses*, 6(8), 2960-2973.

23. Subbramanian, R. A., & Cohen, E. A. (1994). Molecular biology of the human immunodeficiency virus accessory proteins. *Journal of virology*, 68(11), 6831.
24. Sundquist, W. I., & Kräusslich, H. G. (2012). HIV-1 assembly, budding, and maturation. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 2(7), a006924.
25. Toro-Ascuy, D., Rojas-Araya, B., Valiente-Echeverría, F., & Soto-Rifo, R. (2016). Interactions between the HIV-1 Unspliced mRNA and Host mRNA Decay Machineries. *Viruses*, 8(11), 320.
26. Varghese, F. S., Rausalu, K., Hakanen, M., Saul, S., Kümmerer, B. M., Susi, P., ... & Ahola, T. (2017). Obatoclax inhibits alphavirus membrane fusion by neutralizing the acidic environment of endocytic compartments. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 61(3), e02227-16.
27. Viira, B., Selyutina, A., García-Sosa, A. T., Karonen, M., Sinkkonen, J., Merits, A., & Maran, U. (2016). Design, discovery, modelling, synthesis, and biological evaluation of novel and small, low toxicity s-triazine derivatives as HIV-1 non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 24(11), 2519-2529.

Kasutatud veebiaadressid:

1. AIDS info. (2017). FDA-Approved HIV Medicines <https://aidsinfo.nih.gov/understanding-hiv-aids/fact-sheets/21/58/fda-approved-hiv-medicines/> (19.04.2017)
2. Life Technologies Corporation. (2010). ViraPower™ Lentiviral Expression Systems https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/virapower_lentiviral_system_man.pdf (07.03.2017)
3. Randoja R. (2015). Inimese immuunpuudulikkuse viiruse (HIV) uuringud <http://www.kliinikum.ee/yhendlabor/images/stories/kasiraamat/HIJ/inimese%20immuunpuudulikkuse%20viiruse%20uuringud.pdf> (14.12.2016)
4. Schrödinger. Docking and Scoring. <https://www.schrodinger.com/science-articles/docking-and-scoring> (26.05.2017)
5. Sigma-Aldrich. s-Triazine. http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/t46051?lang=en®ion=EE&cm_sp=I-nsite_-recent_fixed_-recent5-3 (12.03.2017)
6. SYNLAB. Inimese immuunpuudulikkuse viiruse 1. ja 2. tüübi vastane antikeha, p24 antigeen (S-HIV 1,2 Ag+Ab). <http://synlab.ee/arstile/laboriteatmik/tulemuste->

[interpretatsioonid/nakkushaiguste-diagnostika/inimese-immuunpuudulikkuse-viiruse-1-ja-2-tuubi-vastane-antikeha-p24-antigeen-s-hiv-1-2-ag-ab/](#) (14.12.2016)

7. Thermo Fisher Scientific Inc. (2015). Growth and Maintenance of the 293FT Cell Line
[https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/Growth_and_Maintenance_of_293FT_Cell_Line_UG.pdf](#) (21.05.2017)
8. World Health Organization, (2016). HIV/AIDS
[http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs360/en/](#) (05.12.2016)

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Tatjana Pungar

(sünnikuupäev: 02.03.1995)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose “HIV-1 viiruslaadsete partiklite mahasurumine triaziini-põhiste ühenditega“, mille juhendaja on Eva Žusinaite
 - 1.1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
 - 1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 29.05.2017